

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12P 7/64, C11C 1/04, 3/02, 3/10	AI	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/26287
		(43) Date de publication internationale: 29 août 1996 (29.08.96)

(31) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/00226
(22) Date de dépôt international: 13 février 1996 (13.02.96)

(30) Données relatives à la priorité:
95/02153 24 février 1995 (24.02.95) FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés, sauf l'US): SOBREMAR S.A. [FR/FR]: Penangues, F-29900 Concarneau (FR).

(72) Inventeur; et
(75) Inventeur/Déposant (US seulement): BRETON, Gildas [FR/FR]: Penangues, F-29900 Concarneau (FR).

(74) Mandataire: BURTIN, Jean-François; Cabinet GEFIB, 83, rue Anatole-France, F-92300 Levallois-Perret (FR).

(81) Etats désignés: CA, FI, NO, US, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.

(54) Title: ENZYMATIC METHODS FOR POLYUNSATURATED FATTY ACID ENRICHMENT

(54) Titre: PROCÉDES ENZYMATIQUES D'ENRICHISSEMENT EN ACIDES GRAS POLYINSATURÉS

(57) Abstract

A method for use in the field of chemistry and particularly in the chemistry of fats. The method is used to prepare polyunsaturated fatty acid concentrates and comprises selectively enzymatically hydrolysing a fish oil containing docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) in position 1, 2 or 3, to give a mixture of free fatty acids, monoglycerides and diglycerides, separating the components of the mixture, recovering the free fatty acids and purifying them by ultra crystallisation to increase the EPA and DHA content, decomplexing the isolated fatty acids, and performing interesterification between the free fatty acids having a high polyunsaturated fatty acid concentration and the unprocessed oil, in the presence of a position- or steric hindrance-specific lipase, to give a polyunsaturated fatty acid triglyceride-enriched mixture which is separated while the free fatty acids are removed therefrom. A method for enzymatically enriching phospholipids with polyunsaturated fatty acids (EPA, DHA), and the synthesis of polyunsaturated fatty acid monoglycerols of series n3 by enzymatic synthesis using 1,2-diacylglycerol as the starting material, are also disclosed. The resulting products are suitable for use in foodstuffs, cosmetics and pharmaceuticals.

(57) Abrégé

L'invention se rapporte au domaine de la chimie et plus particulièrement à celui de la chimie des corps gras. L'invention réside essentiellement dans un procédé d'obtention de concentrés d'acides gras polyinsaturés qui consiste à soumettre une huile de poisson contenant de l'acide docosahexaénoïque (DHA) et de l'acide eicosapentaénoïque (EPA), à une hydrolyse enzymatique sélective, en position 1, 3 ou 2, pour obtenir un mélange d'acides gras libres, de monoglycérides et de diglycérides, à séparer les constituants de ce mélange, à recueillir les acides gras libres que l'on purifie par cristallisation à l'urée, pour augmenter la teneur en EPA et en DHA, à décomplexer les acides gras isolés, à effectuer une interestérification entre les acides gras libres, concentrés en acides gras polyinsaturés et l'huile brute, en présence d'une lipase spécifique de position ou d'encombrement stérique, afin d'obtenir un mélange enrichi en triglycérides d'acides gras polyinsaturés que l'on sépare et que l'on débarrasse des acides gras libres. L'invention réside aussi dans un procédé d'enrichissement en acides gras polyinsaturés (EPA, DHA) de phospholipides par voie enzymatique, ainsi que dans la synthèse de monoglycérols d'acides gras polyinsaturés de la série n3, par synthèse enzymatique à partir d'un 1,2-diacylglycérol. Applications des produits au domaine de l'alimentation, de la cosmétique et de la pharmacie.



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12P 7/64, C11C 1/04, 3/02, 3/10	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/26287 (43) Date de publication internationale: 29 août 1996 (29.08.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/00226 (22) Date de dépôt international: 13 février 1996 (13.02.96) (30) Données relatives à la priorité: 95/02153 24 février 1995 (24.02.95) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): SOBREMAR S.A. [FR/FR]; Penanguer, F-29900 Concarneau (FR). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): BRETON, Gildas [FR/FR]; Penanguer, F-29900 Concarneau (FR). (74) Mandataire: BURTIN, Jean-François; Cabinet GEFIB, 85, rue Anatole-France, F-92300 Levallois-Perret (FR).		(81) Etats désignés: CA, FI, NO, US, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>

(54) Title: ENZYMATIC METHODS FOR POLYUNSATURATED FATTY ACID ENRICHMENT**(54) Titre:** PROCÉDES ENZYMATIQUES D'ENRICHISSEMENT EN ACIDES GRAS POLYINSATURÉS**(57) Abstract**

A method for use in the field of chemistry and particularly in the chemistry of fats. The method is used to prepare polyunsaturated fatty acid concentrates and comprises selectively enzymatically hydrolysing a fish oil containing docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) in position 1, 2 or 3, to give a mixture of free fatty acids, monoglycerides and diglycerides, separating the components of the mixture, recovering the free fatty acids and purifying them by urea crystallisation to increase the EPA and DHA content, decomplexing the isolated fatty acids, and performing interesterification between the free fatty acids having a high polyunsaturated fatty acid concentration and the unprocessed oil, in the presence of a position- or steric hindrance-specific lipase, to give a polyunsaturated fatty acid triglyceride-enriched mixture which is separated while the free fatty acids are removed therefrom. A method for enzymatically enriching phospholipids with polyunsaturated fatty acids (EPA, DHA), and the synthesis of polyunsaturated fatty acid monoacylglycerols of series n3 by enzymatic synthesis using 1,2-dialkylene glycerol as the starting material, are also disclosed. The resulting products are suitable for use in foodstuffs, cosmetics and pharmaceuticals.

(57) Abrégé

L'invention se rapporte au domaine de la chimie et plus particulièrement à celui de la chimie des corps gras. L'invention réside essentiellement dans un procédé d'obtention de concentrés d'acides gras polyinsaturés qui consiste à soumettre une huile de poisson contenant de l'acide docosahexaénoïque (DHA) et de l'acide eicosapentaénoïque (EPA), à une hydrolyse enzymatique sélective, en position 1, 3 ou 2, pour obtenir un mélange d'acides gras libres, de monoglycérides et de diglycérides, à séparer les constituants de ce mélange, à recueillir les acides gras libres que l'on purifie par cristallisation à l'urée, pour augmenter la teneur en EPA et en DHA, à décomplexer les acides gras isolés, à effectuer une interestérification entre les acides gras libres, concentrés en acides gras polyinsaturés et l'huile brute, en présence d'une lipase spécifique de position ou d'encombrement stérique, afin d'obtenir un mélange enrichi en triglycérides d'acides gras polyinsaturés que l'on sépare et que l'on débarrasse des acides gras libres. L'invention réside aussi dans un procédé d'enrichissement en acides gras polyinsaturés (EPA, DHA) de phospholipides par voie enzymatique, ainsi que dans la synthèse de monoacylglycerols d'acides gras polyinsaturés de la série n3, par synthèse enzymatique à partir d'un 1,2-dialcoylène glycérol. Application des produits au domaine de l'alimentation, de la cosmétique et de la pharmacie.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

**PROCEDES ENZYMATIQUES D'ENRICHISSEMENT
EN ACIDES GRAS POLYINSATURES**

La présente invention a pour objet des nouveaux procédés de
5 production d'esters d'acides gras polyinsaturés sous forme pure
ou concentrée.

Elle a plus particulièrement pour objet des procédés de
production d'esters d'acides gras polyinsaturés de la série ω -
10 3 à partir de glycérides d'acides gras extraits d'huiles de
poissons, de phospholipides, ou de 1,2-dialcoylène glycérols, à
l'aide d'un traitement enzymatique.

Elle a spécifiquement pour objet un procédé de production de
15 glycérides d'acides gras polyinsaturés sous forme pure ou
concentrée à partir d'huile de poissons ou d'autres sources,
caractérisé en ce qu'il permet d'obtenir, par traitement
enzymatique, un mélange renfermant une teneur élevée d'acide
docosahexaénoïque (DHA) et/ou d'acide eicosapentaénoïque (EPA),
20 pouvant atteindre dans le cas d'huiles de poisson, 60 %.

Elle a également pour objet un procédé de production de
glycérides d'acides gras polyinsaturés, caractérisé en ce que
l'on obtient au départ de phospholipides naturels, en présence
25 d'acides gras polyinsaturés, par traitement enzymatique, des
phospholipides dont la teneur en EPA et/ou DHA représente
environ 50 % des acides gras totaux.

L'invention se rapporte aussi à un procédé de production de
30 glycérides synthétiques, caractérisé en ce que l'on soumet un
1,2-dialcoylène glycérol à une action enzymatique en présence
d'acides gras polyinsaturés concentrés ou purs, pour obtenir un
monoacylglyceride dont la teneur en EPA et DHA représente au
moins 70% des acides gras totaux

35 L'invention concerne en particulier un procédé d'obtention de
concentrés d'acides gras polyinsaturés qui consiste à soumettre
une huile de poisson contenant du DHA et de l'EPA, à une

hydrolyse enzymatique sélective, en position 1, 3 ou 2, pour obtenir un mélange d'acides gras libres, de monoglycérides et de diglycérides, à séparer les constituants de ce mélange, à recueillir les acides gras libres que l'on purifie par
5 cristallisation à l'urée, pour augmenter la teneur en EPA et/ou en DHA, à décomplexer les acides gras isolés, à effectuer une interestérification entre les acides gras libres, concentrés en acides gras polyinsaturés et l'huile brute, en présence d'une lipase spécifique de position ou d'encombrement stérique, afin
10 d'obtenir un mélange enrichi en glycérides d'acides gras polyinsaturés, que l'on sépare et que l'on débarrasse des acides gras libres.

D'une manière préférée, on utilise l'huile de sardine obtenue
15 par pression des sardines fraîches pêchées dans les mers froides. La sardine offre l'avantage d'un approvisionnement facile et constant. Au contraire, l'huile d'orbitales oculaires de thon, exploitée industriellement, quoique présentant une teneur plus élevée en EPA et DHA, présente l'inconvénient que
20 l'approvisionnement est limité en matière première.

L'hydrolyse enzymatique initiale a pour effet de scinder la fonction ester du glycérol estérifié par un acide gras polyinsaturé et de laisser intactes les autres fonctions esters
25 selon le schéma.A.

Il est possible également, d'hydrolyser les triglycérides présents dans l'huile de sardine par une lipase non spécifique de manière à obtenir un mélange d'acides gras libres dans
30 lequel les acides gras polyinsaturés représentent environ 30 % du mélange total. Ce mélange d'acides gras est fractionné par des moyens physiques pour conduire à un mélange dans lequel les acides gras polyinsaturés et notamment l'EPA et le DHA prédominent, pouvant aller jusqu'à 70-80 % du mélange d'acides
35 gras libres.

Les acides gras polyinsaturés libres sont reestérifiés en présence d'un enzyme et notamment en présence soit d'une lipase non spécifique soit d'une lipase spécifique de la position 2.

Si on utilise une lipase non spécifique, le glycérol sera mis à réagir avec le mélange d'acides gras libres polyinsaturés et on obtient un triglycéride dont la teneur en acide gras polyinsaturé est de l'ordre de 60 %.

Si on interestérifie à l'aide d'une lipase spécifique de la position AG.2 un mélange d'acides gras polyinsaturés déjà concentré et d'un glycéride estérifié en une seule position par un acide gras polyinsaturé, on peut obtenir un diglycéride-1,2 dont deux positions seulement sont estérifiées par un acide gras polyinsaturé.

Il est également possible d'hydrolyser un triglycéride dont la position 2 est estérifiée par un acide gras polyinsaturé à l'aide d'un enzyme spécifique et notamment par une lipase du type SN.2 spécifique, pour obtenir un mélange d'acides gras polyinsaturés libres, de monoglycérides et de diglycérides ayant une teneur en acides gras polyinsaturés comprise entre 80 et 100 %

Après fractionnement de ce mélange, les acides gras libres sont purifiés par cristallisation à froid en présence d'urée, pour augmenter la teneur en EPA et en DHA. Ce mélange concentré est alors soumis à une interestérification par un triglycéride dont la position 2 est occupée par un acide gras polyinsaturé, et les positions 1,3 par un acide gras saturé, en présence d'une lipase-1,3 spécifique, de façon à obtenir un triglycéride dont au moins deux hydroxyles sont estérifiés par un acide gras polyinsaturé.

L'invention concerne également un procédé de synthèse de triglycerides enrichis en acides gras non saturés, qui consiste à saponifier l'huile de poisson par voie chimique ou par voie enzymatique, pour obtenir un mélange d'acides gras saturés et non saturés, à convertir les acides gras saturés en esters d'alcoyle inférieur en présence d'une lipase sélective pour obtenir un mélange d'esters d'alcoyle d'acides gras saturés et

d'acides gras non saturés, à séparer les esters d'alcoyle d'acide gras saturés, à recueillir les acides gras non saturés libres et à faire réagir ces acides gras avec le glycérol en présence d'une lipase spécifique pour obtenir un mélange de
5 triglycerides enrichis en acides gras polyinsaturés.

Les schémas joints illustrent ces diverses variantes du procédé.

10 L'enrichissement de l'huile brute de sardine, par extraction des acides gras polyinsaturés (AGHI), d'une teneur moyenne de 30 % à une teneur correspondant à 50-60 % du total en acides gras peut être mené selon l'un des deux procédés schématisés (A et B) selon l'invention.

15 Jusqu'à ces dernières années, la majorité de la production d'huile de poissons, considérée comme un sous-produit de la transformation, était destinée, après hydrogénation, à la fabrication de la margarine. La faible valeur ajoutée du
20 produit et la mise en oeuvre de traitements physico-chimiques pour l'extraction, la désodorisation, la décoloration et l'hydrogénation entraînant une destruction des propriétés de l'huile, explique le peu d'intérêt des industriels en ce qui concerne ce type de procédé.

25 La principale caractéristique des huiles de poissons est leur teneur naturelle élevée (20-30 %) en acides gras polyinsaturés, de types ω -3, et en particulier en acides docosaénoïque (DHA) et eicosapentaénoïque (EPA). A l'heure actuelle, l'huile
30 de poisson est la seule source commercialement exploitable d'acides gras polyinsaturés à longue chaîne, malgré les tentatives de production par des procédés microbiologiques.

Depuis les études épidémiologiques rapportées par Bang et al en
35 1971, et les études physiologiques sur ce sujet, il est apparu que les acides gras essentiels sont les principaux constituants des phospholipides de la rétine, de la matière grise, de l'épiderme; ils jouent un rôle important au niveau du système

nerveux central et présentent des propriétés pharmacologiques importantes dans les maladies cardio-vasculaires, en tant qu'antithrombotiques. En conséquence, l'intérêt que montrent les industries pharmaceutiques, cosmétiques et parapharmaceutiques est à l'origine d'un marché en pleine expansion, aux USA, au JAPON et en EUROPE. Le marché des AGHI (acides gras polyinsaturés), sur la base de la qualité des huiles et donc de la valeur ajoutée, présente 3 domaines d'utilisation :

- les huiles brutes, jusqu'à 30 % en AGHI, pour les applications en Industrie agro-alimentaire (IAA), l'oléochimie, biopolymères, alimentation animale.
- les huiles enrichies, de 30 à 60 %, pour les applications pharmaceutiques et cosmétiques.
- les AGHI purifiés, de 80 à 98 % pour la pharmacie.

Actuellement, les motifs de contestation de l'industrie de l'huile de poisson se situent à différents niveaux, compte tenu de ces nouveaux marchés.

- * qualité de la matière première
- * stabilité des caractéristiques techniques au cours de l'année, nécessitant donc une sélection des huiles
- * méthodes d'extraction à reconsidérer
- * définition des conditions de raffinage en fonction des cahiers des charges
- * conditions de stockage

Les huiles de poissons, sardines ou foie de morue, contiennent en moyenne 20 à 30 % d'EPA+DHA par rapport au total des acides gras. Parmi la grande variété d'huiles de poisson, les huiles d'orbitales oculaires de thon, exploitées industriellement, se caractérisent par une teneur plus importante, jusqu'à 40 %, mais l'approvisionnement en matière première est la principale limite à sa production. Bien qu'il soit plus aisé de purifier des AGHI, libres ou sous la forme d'esters éthyliques, la demande du marché des AGHI, en particulier la pharmacie et la cosmétique, concerne exclusivement les acides gras sous forme

naturelle de triglycérides pour des raisons d'efficacité. En partant d'huiles contenant jusqu'à 30 % en EPA et DHA, de nombreuses techniques sont applicables à l'huile brute, telles que la wintérisation, la distillation moléculaire ou la
5 cristallisation par solvant.

Du fait du nombre de combinaisons possibles de la position des acides gras sur les triglycérides, le fait d'obtenir à partir d'une huile brute, des teneurs en AGHI supérieure à 30 %
10 nécessite la mise en oeuvre de techniques plus complexes. Cependant, le fractionnement des acides gras libres ou estérifiés, jusqu'à 65-80 % est possible par un certain nombre de méthodes, telles que l'extraction par fluide supercritique, la complexation à l'urée, la chromatographie, la séparation sur
15 zéolite et même la séparation jusqu'à 90 % est possible par HPLC.

En dehors de ces méthodes physico-chimiques, l'enrichissement par voie enzymatique a été utilisé avec succès sur des huiles
20 végétales.

Les techniques physico-chimiques, du fait de leur coût en investissement (par exemple 3MF pour un extracteur FSC industriel de 1 m³), ne peuvent être économiquement viables que
25 pour des enrichissements supérieurs à 80 % caractérisés par une forte valeur ajoutée. Par contre, les techniques enzymatiques, plus simples et donc moins coûteuses, sont en théorie bien adaptées dans un créneau allant de l'huile brute à une huile titrant 55-60 % en AGHI.

30

En effet, depuis quelques années, de nombreux travaux ont montré l'importance physiologique et diététique des acides gras polyinsaturés et surtout de l'acide eicosapentaénoïque (ou EPA = acide Δ -5, 8, 11, 14, 17-eicosapentaénoïque) et de l'acide
35 docosahexaénoïque (ou DHA = acide Δ -4, 7, 10, 13, 16, 19-docosahexaénoïque). Ces composés ne se forment dans l'organisme humain qu'en très petites quantités et les quantités produites selon les deux schémas biologiques ci-après, vont en diminuant

au cours des années, de telle sorte qu'il peut en résulter une carence chez les femmes enceintes et chez les personnes âgées. Le schéma ci-après résume le schéma de formation des acides gras polyinsaturés dans l'organisme.

5

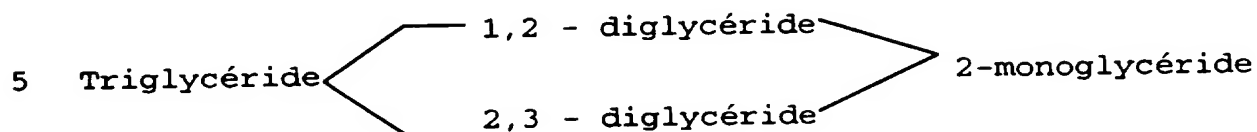
n-6	n-3
18:2 Δ -9, 12 (acide linoléique)	18:3 Δ -9,12,15 (acide α -linolénique)
↓ Δ -6 desaturase	↓
18:3 Δ -6,9,12 (acide γ -linoléique)	18:4 Δ -6,9,12,15 (acide octadécatétraénoïque)
↓ élongation	↓
20:3 Δ -8,11,14 (acide dihomog- γ -linolénique)	20:4 Δ -8,11,14,17 (acide eicosatétraénoïque)
↓ Δ -5 desaturase	↓
20:4 Δ -5,8,11,14 (acide arachidonique)	20:5 Δ -5,8,11,14,17 (acide eicosapentaénoïque)
↓ élongation	↓
22:4 Δ -7,10,13,16 (acide adrénique)	22:5 Δ -7,10,13,16,19 (acide docosapentaénoïque)
↓ Δ -4 desaturase	↓
22:5 Δ -4,7,10,13,16 (acide docosapentaénoïque)	22:6 Δ -4,7,10,13,16,19 (acide docosaheptaénoïque)

Les applications des enzymes dans le traitement du poisson sont multiples, production d'hydrolysats protéiques par des protéases, ensilage, dépeçage du thon, attendrissement de la chair, hydrolyse des tissus enveloppant les oeufs (caviar), élimination des membranes de foie. En ce qui concerne les huiles, de nombreuses publications montrent l'intérêt des traitements enzymatiques pour extraire et purifier les acides gras polyinsaturés. Les enzymes les plus couramment utilisées sont des lipases qui permettent, soit d'hydrolyser les triglycérides en acides gras et glycérol dans des conditions aqueuses, soit inversement, d'estérifier les acides gras dans des conditions anhydres ou en présence de solvants organiques.

10

15

De nombreuses lipases hydrolysent les triglycérides selon la séquence suivante :



Cependant, certains lipases ne répondent pas à cette cinétique du fait de la "reconnaissance" spécifique :

- 10 - de certains acides gras
- de la position de ces acides gras sur le triglycéride
- de glycérides de différents poids moléculaires ou
- de leur stéréospecificité.
- 15 Il existe ainsi de nombreuses lipases de spécificités différentes :
- les lipases intestinales ou de tissu adipeux, du muscle d'insectes, qui hydrolysent préférentiellement les
 - 20 monoglycérides comparativement aux triglycérides.
 - les lipases de Mucor, de Rhizopus, de lait, et la lipase pancréatique de porc, qui sont spécifiques des positions 1,3 sur le triglycéride, alors que la lipase de Pseudomonas est spécifique de la position 2.
 - 25 • la lipase de Candida qui hydrolyse préférentiellement les liaisons d'ester de DHA.
 - la lipase de chou (B.napus) qui reconnaît la position de la double liaison sur les acides gras et différencie l'acide α -linoléique du DHA, ou la lipase de Geotrichum qui est
 - 30 spécifique des acides gras contenant des insaturations CIS-9 et CIS-9 -CIS-12.

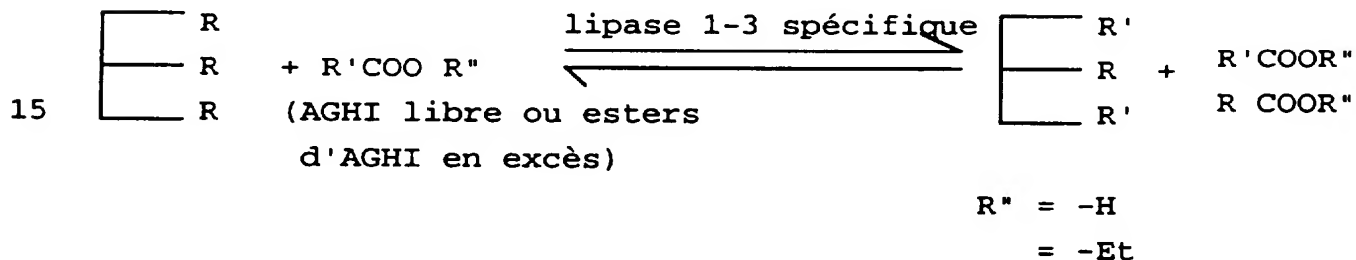
Cette spécificité des lipases est généralement à la base des procédés de fractionnement d'acides gras commercialement

35 intéressants contenus dans les huiles végétales ou de poissons.

On a ainsi décrit des procédés d'enrichissement d'acide α -linoléique dans une huile de primevère (de 9,5 % à 64,6 %)

avec une lipase de chou; de DHA dans une huile de foie de morue (de 12,7 à 45,9 %) avec une lipase de Mucor; d'EPA + DHA dans une huile de foie de morue (de 23 à 72,2 %) avec une lipase de Mucor; de DHA dans une huile de thon (facteur de concentration=3) avec une lipase de Candida; d'acide 5-eicosaénoïque (20:1) dans une huile de Meadowfoam (de 83,5 à 95 %) par une lipase de Chromobactérium.

Schématiquement, la préparation de triglycérides enrichis en AGHI est basée sur une interestérification catalysée par une lipase sélective :



Cependant, les procédés enzymatiques antérieurs nécessitent un apport d'AGHI, libres ou estérifiés, de pureté élevée. En conséquence, cet apport doit être précédé d'une hydrolyse totale des triglycérides pour libérer les AGHI libres par une lipase et d'une purification par voie chimique ou à l'aide de lipases spécifiques.

Ce sont des difficultés particulières que le présent procédé vise à résoudre.

Selon un des procédés de l'invention, il est nécessaire de déterminer au préalable la position des acides gras polyinsaturés dans les triglycérides d'huile de sardines traitée. Selon les espèces, et peut-être selon les saisons, les acides gras polyinsaturés sont soit en position 2, soit en position 1,3. Il est donc nécessaire, après cette détermination, de choisir une lipase appropriée pour la réaction d'hydrolyse comme pour la réaction d'interestérification ou de transestérification. La technique

utilisée pour déterminer cette position, est basée sur l'hydrolyse par des enzymes spécifiques et sur l'analyse par des méthodes physiques (CPG, CCM ou HPLC) de la teneur en EPA et en DHA dans les produits d'hydrolyse.

5

A partir des stocks d'enzymes disponibles dans le commerce (estérases et lipases), immobilisés ou non, les tests d'hydrolyse ont été effectués pour déterminer l'optimum en matière de teneur en acides gras polyinsaturés de manière à ce
10 que les étapes ultérieures de séparation et de purification soient facilitées.

Les paramètres étudiés ont été les suivants :

- 15 • choix des enzymes en fonction de leur spécificité : hydrolyse des longues chaînes d'AG, hydrolyse des courtes chaînes spécifiquement, hydrolyse des liaisons EPA et DHA spécifiquement
- teneur en eau (dont dépend la cinétique de la réaction)
- 20 • rapport huile/enzyme
- température
- inhibition par les produits de la réaction

A partir des résultats à l'échelle du laboratoire, une montée
25 en échelle (scale-up) (facteur 10) a été expérimenté pour évaluer la rentabilité économique de cette phase.

Ces essais ont montré que trois enzymes conduisaient aux meilleurs rapports EPA/DHA, à savoir :

- 30 - une lipase de *Pseudomonas fluorescens*
- une lipase de *Mucor javanicus*
- une lipase de *Mucor miehei*

Les résultats fournissent une teneur en triglycérides à acides
35 gras polyinsaturés à 70 % environ, avec un rapport EPA/DHA de l'ordre de 1.

A l'étape suivante, les acides gras libres sont séparés des autres produits d'hydrolyse (monoglycérides, diglycérides, glycérol) par lavage à l'eau basique ou par saponification.

- 5 La troisième étape du procédé consiste à purifier le mélange d'acides gras libres par cristallisation à froid en présence d'urée en milieu éthanolique.

10 Les essais effectués ont montré que les acides gras à longue chaîne en C_{20} ou en C_{22} cristallisaient plus facilement à froid ($-10^{\circ}C$) après complexation à l'urée et qu'ainsi, on pouvait obtenir une concentration et des rendements intéressants en acides gras polyinsaturés (de 63 à 83 %). Cependant, cette technique basée sur la solubilité différentielle des acides
15 gras dans le solvant utilisé, nécessite une adaptation aux acides gras polyinsaturés désirés et une optimisation des paramètres de précipitation (température, rapports Urée/Acide gras polyinsaturé) et des conditions de décomplexation.

- 20 L'étape de saponification nécessaire pour séparer les acides gras libres des autres produits de l'hydrolyse enzymatique doit répondre à des conditions expérimentales précises, car elle détermine les effets des produits d'hydrolyse sur les lipases spécifiques et non spécifiques, sur le rendement de séparation
25 et sur le rendement de purification.

L'étape d'interestérification de l'huile brute par des acides gras polyinsaturés concentrés, est une étape enzymatique inverse de l'étape initiale du procédé selon l'invention. Elle
30 nécessite des conditions expérimentales totalement différentes pour déplacer l'équilibre réactionnel et, en particulier, le choix de la concentration en eau, la présence éventuelle de solvants organiques ou le choix du pH et des concentrations. Les acides gras polyinsaturés concentrés sont mis en contact
35 avec l'huile de poissons brute et avec l'enzyme choisi. L'enzyme utilisé est une lipase spécifique des liaisons esters ne contenant pas d'acide gras polyinsaturé, de manière à préserver la liaison ester combinée à un acide gras

polyinsaturé présent, initialement, dans l'huile brute
($\pm 30 \%$).

La teneur en eau est de préférence faible et maintenue
5 constante. La nature du solvant, s'il y en a, est importante.
Celui-ci doit être compatible avec l'enzyme.

D'une manière préférée, l'enzyme utilisée est une lipase de
Mucor miehei commercialisée sous la dénomination NOVOZYME 435
10 par la Société Novo Nordisk.

L'enzyme utilisé peut être séparé en fin de réaction et,
éventuellement, réutilisé. Un enzyme immobilisé permet plus
facilement une séparation et une réutilisation.

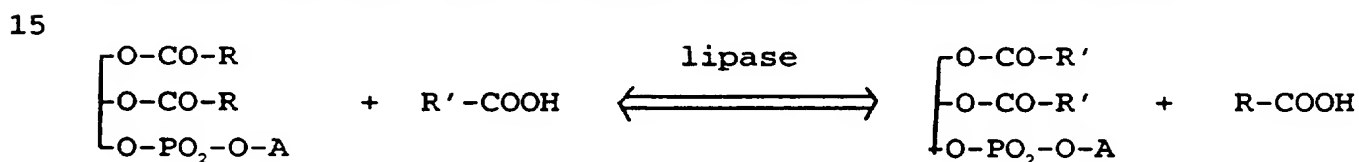
15 Après réaction d'interestérification, les acides gras libres
sont séparés par lavages en phase aqueuse à pH basique. Les
triglycérides formés ne passent pas en phase aqueuse et peuvent
ensuite être repris par un solvant. Par évaporation, on obtient
20 le mélange concentré désiré renfermant entre 50 et 70 %
d'acides gras polyinsaturés.

La détermination de la position des acides gras polyinsaturés
sur les triglycérides permet d'effectuer le choix entre les
25 deux variantes de procédé :
position 1,3 \rightarrow procédé A
position SN.2 \rightarrow procédé B

L'invention a encore pour objet des concentrés d'acides gras
30 polyinsaturés, riches ou enrichis en acide eicosapentaénoïque
et en acide docosahexaénoïque, obtenus par le procédé selon
l'invention. Elle a encore pour objet, des triglycérides
enrichis en acide eicosapentaénoïque et en acide
docosahexaénoïque obtenus par le procédé d'interestérification
35 selon l'invention.

Elle a aussi pour objet les huiles de poissons et notamment les huiles de sardines enrichies ou concentrées en EPA et/ou en DHA obtenues selon le procédé de l'invention.

- 5 L'invention réside également dans un procédé d'enrichissement en acides gras polyinsaturés (EPA $C_{20:5n3}$, DHA $C_{22:6n3}$) de phospholipides par voie enzymatique qui consiste à faire réagir un ou des phospholipides avec un AGHI de la série n3 en présence d'une lipase pour obtenir un phospholipide modifié.
- 10 Il s'agit de modifier la composition en acides gras des phospholipides par le procédé enzymatique précédemment décrit, c'est à dire par une réaction de transestérification faisant réagir AGHI et phospholipides en présence d'une lipase. La réaction peut être schématisée de la façon suivante:



20 Phospholipides + AGHI(n3) Phospholipides+Acides gras modifiés

A:éthanolamine, R':acide gras
 sérine ou choline de la série n3
 EPA-DHA

- 25 Cette transesterification s'opère sans solvant organique en seule présence des phospholipides, des acides gras libres (AGPI) et de l'enzyme.Cependant, certains travaux semblent
- 30 indiquer que l'utilisation de solvants à constante diélectrique élevée favorise l'interestérification d'acides gras (Hosokawa & all, 1995; Mustranta & all, 1994; Mutua & all, 1993).La présence d'un tamis moléculaire (3A) piégant l'eau, améliore la transestérification des AGHI.

- 35 Après réaction, il est nécessaire de purifier les produits, c'est à dire les acides gras libres du pool de phospholipides,

par exemple par chromatographie sur colonne de silice ou par toute autre technique de séparation (ex:ultrafiltration).

Les phospholipides obtenus contiennent une teneur en EPA et DHA d'environ 50% des acides gras totaux.

5

Les phospholipides sont d'importants constituants majoritaires des membranes cellulaires. Les chaînes d'acides gras les composants jouent un rôle essentiel au niveau de la fluidité membranaire et plus particulièrement les chaînes d'acides gras hautement polyinsaturés dont l'EPA et le DHA, qui permettent un fonctionnement cellulaire normal.

10

Par ailleurs, les phospholipides ont des applications en cosmétologie (liposomes) et dans l'industrie agro-alimentaire du fait de leur caractère amphiphile.

15

L'invention a aussi pour objet les phospholipides enrichis ou concentrés en EPA et/ou DHA obtenus selon le procédé de l'invention.

20

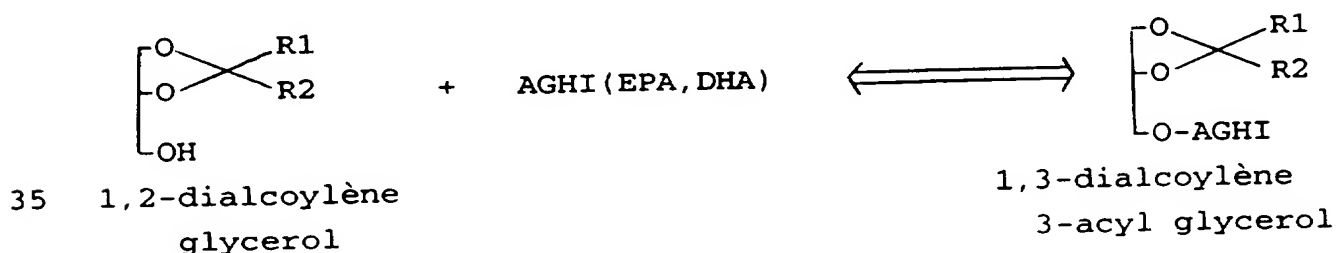
L'invention concerne encore la synthèse de monoacylglycerols d'AGHI (n-3) par synthèse enzymatique à partir d'un 1,2 alcoylène glycerol.

Le procédé selon l'invention consiste à faire réagir des AGHI (n3) en présence d'une lipase (exemple: lipase de Mucor miehei) avec du glycerol dont deux des fonctions alcools sont bloquées, par la voie précédemment décrite pour la synthèse enzymatique des triglycérides.

25

La synthèse des monoesters glyceriques d'AGHI n-3 (EPA, DHA) peut être schématisée de la façon suivante:

30



35

En faisant réagir des AGHI purifiés, contenant au moins 70% d'EPA et DHA, on peut envisager d'obtenir des monoacylglycérides dont l'EPA et le DHA représentent au moins 70% des acides gras totaux.

5

Les monoglycérides sont recherchés principalement pour leurs propriétés émulsionnantes dans les domaines de la cosmétique, de la pharmacie et de l'agroalimentaire.

10 L'invention a encore pour objet les monoesters glycériques enrichis ou concentrés en EPA et/ou en DHA obtenus selon le procédé de l'invention.

15 Il va de soi que les procédés de l'invention peuvent comporter de nombreuses variantes pour s'adapter aux diverses modalités particulières rendues nécessaires par la variabilité de la matière première et notamment de l'huile de poisson dans sa teneur en acides gras et dans les rapports triglycérides d'acides gras polyinsaturés et triglycérides d'acides gras
20 saturés, sans pour cela sortir du cadre de l'invention.

On peut également remplacer une ou plusieurs étapes des procédés décrits ci-dessus par une extraction à l'aide d'un fluide super critique comme par exemple le CO₂ supercritique.

25

Exemple 1

Saponification : les triglycérides sont saponifiés à partir d'une huile de préférence riche en AGHI. La réaction s'effectue
30 en milieu éthanolique basique, par exemple 1 volume d'huile de sardine pour 1 volume du mélange de saponification (1/3 d'eau à 20 % de soude, 2/3 éthanol à 99 %) porté à chaud (70°C) pendant environ 30 mn sous atmosphère inerte.

A la suite d'étapes successives de lavage à pH acide (faisant
35 passer les acides gras sous la forme R-COOH), les acides sont récupérés par séparation de phase.

Fractionnement à l'urée : l'éthanol est saturé à l'urée. Cette saturation permet de se libérer des problèmes de température de fractionnement.

Les rapports d'épuisement sont :

5 1 volume d'huile/2 volumes d'urée/ 6 à 8 volumes d'éthanol
La phase enrichie atteint des valeurs voisines de 85 % d'AGHI par rapport aux acides gras totaux.

C'est ainsi qu'en partant d'une huile de poisson à 20 % d'AGHI, on a pu obtenir une fraction contenant 70 à 75 % d'EPA+DHA par rapport aux acides gras totaux. Les rendements en AGHI obtenus
10 par ce procédé sont proches de 85 %.

Résultats de l'hydrolyse enzymatique : le positionnement préférentiel des AGHI sur le squelette glycérique est :

- 15 • le DHA préférentiellement en position β à environ 60 %
• l'EPA répartition quasi uniforme en α , β .

Le résultat du criblage des enzymes testés figure dans le tableau ci-après.

20

Dans ces premières données, il n'a pas été observé d'hydrolyse qui enrichisse la fraction d'acides gras libres en EPA et/ou DHA. On note par contre une augmentation en EPA ou DHA dans la fraction des monoacylglycérides.

25

Les monoacylglycérides à teneur élevée en AGHI oméga 3, produits, peuvent constituer une voie de commercialisation possible. En effet, ils seraient plus facilement absorbés au niveau de la paroi intestinale comparativement aux
30 triglycérides. Par ailleurs, les AGHI sont préférables sous leur forme de monoacylglycérides à leur forme libre très oxydable. Suivant sa spécificité, la lipase hydrolyse le triglycéride soit en fonction des positions sur le glycéride soit en fonction de l'encombrement stérique des acides gras.
35 Ainsi, le choix de la lipase appliquée sur une huile dont la répartition des acides gras sur le squelette glycérique est connue, permet d'exercer une influence sur la balance EPA/DHA, en fonction de l'application visée.

Les acides gras produits par l'hydrolyse sont éliminés par lavage à l'eau basique. Suivant ce procédé, aucun solvant n'est utilisé.

5

Résultats : Criblage de l'activité des lipases
sur de l'huile de sardine

Enzyme utilisée		Répartition après hydrolyse (% de la masse) T=100-%TG	AGPI EPA+DHA %	Balance DHA/EPA	Bilan matière en EPA+DHA pour 100g d'huile en g en %	
		AG libres = 0,28	20	1	20	20
Lipase pancréatique de porc	TG	34,1 (T=65)	19,6	1,1	6,7	38,2
	AG	31,7	5,5	0,84	1,74	9,9
	DAG	20,2	25,3	1,0	5,1	29,3
	MAG	13,9	28,4	2,0	3,9	22,6
Lipase de germe de blé		T = 0				
Lipase de Pseudomonas fluorescens	AG	67,7 (T=100)	10,3	1,6	7	34,4
	DAG	6,1	25,3	0,99	1,54	7,7
	MAG	26,2	44	1,1	11,5	57,6
Lipase de Penicillium roqueforti	TG	23,4 (T=77)	21,9	1	5,1	34,4
	AG	37,3	7,8	0,75	2,9	16
	DAG	32,4	25	1	8,1	44,8
	MAG	6,9	28,2	1,68	1,9	10,7
Lipase de Candida cylindracea	TG	64 (T=36)	20,9	1,2	13,4	34,4
	AG	16,8	3,8	1,1	0,64	3,4
	DAG	17,8	24,4	1,4	4,3	23
	MAG	1,5	31,7	1,3	0,47	2,5
Lipase de Rhizopus delemar	AG	68,1 (T=100)	10,1	0,48	6,9	35,7
	DAG	10,4	28,4	3,1	3,0	15,3
	MAG	21,4	44,2	3,3	9,5	48,9
Lipase de Mucor javanicus	AG	73,3 (T=100)	12,8	0,73	9,4	34,4
	DAG	4,5	21,2	2,2	0,95	4,9
	MAG	22,2	40,7	4,1	9	46,6
Lipase de Mucor miehei	AG	77,7 (T=100)	9,4	0,6	7,3	34,4
	DAG	6,5	38,3	2,7	2,5	14,7
	MAG	15,7	45,1	4	7,1	42

Lipase de Rhizopus arrhizus		T = 0				
Contrôle		T = 0				

Résultats après hydrolyse et extraction des MAG+DAG

Enzyme		Rdt	% répartition de la masse	balance DHA/EPA	% EPA+DHA	% EPA	% DHA
Pseudomonas fluorescens	DAG		19	0,99	25,3		
	MAG		81	1,1	44		
	Total	32,3		1,8	40,37	19,4	21
Rhizopus delemar	DAM		33	3,1	28,4		
	MAG		67	3,3	44,2		
	Total	31,8		3,23	39,3	9,3	30
Mucor javanicus	DAG		16,8	2,2	21,2		
	MAG		83,1	4,1	40,7		
	Total	26,7		3,78	37,3	7,8	29,5
Mucor miehei	DAG		30	2,7	38,3		
	MAG		70	4	45,1		
	Total	22,2		3,62	43,2	9,35	33,9

5

Greffage enzymatique :

Exemple d'estérification des AGHI sur du glycérol naturel :

enzyme utilisé : Novozyme 435

15 heures à 45°C

élimination des acides gras libres n'ayant
pas réagi par lavage basique

72% de triglycérides. Triglycérides + diglycérides = 98 %

DHA/EPA = 0,65

EPA+DHA = 68 %

AGHI = 83 %

En tenant compte des trois voies de synthèse, et en se
rapportant aux résultats d'hydrolyse de différents enzymes, la

10

15

20

première voie, c'est-à-dire l'hydrolyse suivie d'un greffage paraît la plus appropriée car elle offre une plus grande souplesse dans la modulation du rapport DHA/EPA. Par ailleurs, les produits d'hydrolyse, représentés de façon majoritaire par des monoacylglycérides sont susceptibles d'être commercialisables.

Ainsi, suivant la lipase utilisée, on peut obtenir un mélange de mono et diacylglycérides avec soit une balance DHA/EPA de 1,1 avec la lipase de Pseudomonas fluorescens ou bien de 4 avec la lipase de Mucor miehei. Un greffage de ces mono et diacylglycérides avec des AGHI purifiés à une balance DHA/EPA connue, à l'aide d'un enzyme non spécifique (par exemple la préparation Novozyme 435 de la société Novo Nordisk Bioindustries (U.K)) permet d'obtenir des triglycérides riches en AGHI.

On peut remarquer que l'on peut produire facilement des monoacylglycérides riches en AGHI par un greffage enzymatique d'AGHI purifiés sur du glycérol naturel.

Une autre voie possible, celle d'une hydrolyse incomplète avec transestérification simultanée peut permettre d'aboutir à une augmentation des AGHI sur les triglycérides (Y.Shimada et al, 1994).

Exemple 2

phospholipides (origine Lucas meyers base soja):	100g
AGHI purifiés (dont EPA, DHA):	110g
Enzyme (Lipozyme immobilisée IM de Novo Nordisk):	20g
Tamis moléculaire: (3Å)	3 à 5g

La réaction s'opère sous atmosphère inerte, à une température de 45°C avec agitation. Une hydratation préalable de l'enzyme est conseillée. Le temps de réaction est d'environ 9 heures, au delà une oxydation des AGHI en présence peut conduire à une

inhibition des lipases. Les produits de réaction sont ensuite purifiés sur colonne de silice.

5 Les phospholipides obtenus contiennent une teneur en EPA et DHA d'environ 46% des acides gras totaux. (Ce qui doit signifier qu'une seule des deux positions possibles (α , β) peut être estérifiée par de l'EPA ou DHA en présence de la lipase Lipozyme IM).

10

15

20

25

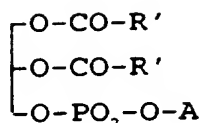
30

35

R E V E N D I C A T I O N S

1. Un procédé d'obtention de glycérides d'acides gras polyinsaturés caractérisé en ce que l'on soumet un glycéride extrait de sources naturelles ou synthétiques à l'action d'un produit enzymatique pour libérer un acide gras et traite le glycéride résultant à l'action d'un acide gras polyinsaturé en présence d'un enzyme pour former un glycéride estérifié par un acide gras polyinsaturé.
2. Un procédé d'obtention de concentrés d'acides gras polyinsaturés selon la revendication 1, par voie enzymatique, qui consiste à soumettre une huile de poisson contenant de l'acide docosahexaénoïque (DHA) et de l'acide eicosapentaénoïque (EPA) à une hydrolyse enzymatique sélective en position 1,3 ou en 2 pour obtenir un mélange d'acides gras libres, de monoglycérides et de diglycérides, à séparer les constituants de ce mélange, à recueillir les acides gras libres que l'on purifie par cristallisation à l'urée pour augmenter la teneur en EPA et en DHA, à décomplexer les acides gras isolés, puis à effectuer une interestérification entre les acides libres concentrés en acides gras polyinsaturés et l'huile brute en présence d'une lipase spécifique de position, afin d'obtenir un mélange enrichi en triglycérides d'acides gras polyinsaturés que l'on sépare et que l'on débarrasse des acides gras libres.
3. Un procédé d'enrichissement selon la revendication 1, en acides gras polyinsaturés (EPA,DHA) de phospholipides par voie enzymatique qui consiste à faire réagir les acides gras polyinsaturés (AGHI) de la série n3 et un phospholipide, en présence d'une lipase, pour obtenir un mélange de phospholipides modifiés et d'acides gras, à séparer ensuite les acides gras libres du pool de phospholipides par une technique de séparation classique pour obtenir un phospholipide de formule:

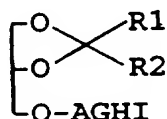
22



5 dans laquelle R' représente un AGHI(n3)
A représente de l'éthanolamine, de la sérine ou de la choline.

10 4. Un procédé d'obtention selon la revendication 1, de monoacylglycérides d'acides gras polyinsaturés (AGHI) de la série n3 qui consiste à faire réagir des AGHI de la série n3 en présence d'une lipase, avec du glycerol dont deux des fonctions alcools sont bloquées sous forme de cétal, pour obtenir un monoacylglycéride de formule:

15



20 dans laquelle R1 et R2 représentent des radicaux alcoyles inférieurs
AGHI représente un acide gras polyinsaturé ayant de 2 à 6 doubles liaisons.

25 5. Un procédé selon la revendication 2 dans lequel l'huile de poisson contenant du DHA et/ou de l'EPA est l'huile de sardines obtenue par pression des sardines pêchées dans les mers froides.

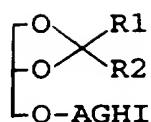
30 6. Un procédé selon l'une des revendications 2 et 5 dans lequel on soumet l'huile de poisson à un traitement enzymatique qui libère d'une manière non sélective tous les acides gras présents et que l'on isole séparément les acides gras polyinsaturés.

35

7. Un procédé selon l'une des revendications 2, 5 et 6 dans lequel le traitement enzymatique fournit un mélange de monoglycérides, de diglycérides et d'acides gras libres.

8. Un procédé selon l'une des revendications 2, 5, 6 et 7 dans lequel les acides gras libres libérés sont constitués principalement d'acides gras polyinsaturés.
- 5 9. Un procédé selon au moins une des revendications 2, 5 à 8 dans lequel on concentre les acides gras polyinsaturés libres par cristallisation avec de l'urée, à froid et en milieu éthanolique.
- 10 10. Un procédé selon au moins une des revendications 2, 5 à 9, dans lequel le mélange concentré d'acides gras polyinsaturés est interestérifié avec un triglycéride dont la position 2 est occupée par un acide gras polyinsaturé en présence d'une lipase-1,3 spécifique pour obtenir un
15 triglycéride dont au moins deux hydroxyles sont estérifiés par un acide gras polyinsaturé.
11. Un procédé selon au moins une des revendications 2, 5 à 9, dans lequel le mélange concentré d'acides gras
20 polyinsaturés est mis à réagir avec le glycérol en présence d'une lipase non spécifique pour obtenir un diglycéride dont deux fonctions alcool sont estérifiées par un acide gras polyinsaturé.
- 25 12. Un procédé selon au moins une des revendications 2, 5 à 9, dans lequel on hydrolyse un triglycéride d'huile de poisson dont une position est estérifiée par un acide gras polyinsaturé, par un enzyme non spécifique, pour obtenir
30 un mélange d'acides gras polyinsaturé libres, de monoglycérides et de diglycérides, on fractionne ce mélange et on purifie les acides gras libres par cristallisation au froid en présence d'urée pour augmenter la teneur en EPA et en DHA, soumet le mélange concentré à
35 une interestérification avec un triglycéride dont au moins une position est occupée par un acide polyinsaturé en présence d'une lipase spécifique de la position 2 pour obtenir un triglycéride à haute teneur en acide gras polyinsaturé.

13. Un procédé selon au moins une des revendications 2, 5 à 9, dans lequel on soumet un triglycéride d'huile de poisson dont une des fonctions hydroxyle est estérifiée par un acide gras polyinsaturé en présence de lipase spécifique 1,3 pour obtenir un mélange d'acide gras polyinsaturé, de mono- et de diglycérides que l'on fait réagir avec un triglycéride dont seule la position 2 se trouve bloquée par un acide gras polyinsaturé en présence d'une lipase 1,3 spécifique pour former un triglycéride dont au moins deux fonctions alcool sont estérifiées par un groupe acyle dérivé d'un acide gras polyinsaturé.
14. Un procédé selon au moins l'une des revendications 2, 5 à 13, dans lequel l'enzyme non spécifique est choisi parmi une lipase de *Pseudomonas fluorescens*, une lipase de *Mucor javanicus* et une lipase de *Mucor mieheï*.
15. Un procédé selon au moins une des revendications 2, 5 à 13, dans lequel l'enzyme spécifique est une lipase de *Candida antartica*, notamment celle commercialisée sous la dénomination Novozyme 435 par la Société Novo Nordisk.
16. Un procédé d'enrichissement selon la revendication 3, en AGHI de phospholipides par voie enzymatique, dans lequel l'enzyme spécifique est une lipase de *Mucor mieheï*, produit commercialisé sous le nom Lipozyme immobilisée IM de Novo Nordisk.
17. Un procédé d'enrichissement selon la revendication 3 en AGHI de phospholipides par voie enzymatique, dans lequel l'hydrolyse enzymatique est effectuée en présence d'un tamis moléculaire.
18. Un procédé d'obtention selon la revendication 4 de monoacylglycéride d'AGHI (n-3) qui consiste à faire réagir un 1,2-dialcoylène glycerol bloqué en présence d'une lipase, avec un acide gras polyinsaturé (AGHI) pour obtenir un 1,2-dialcoylène 3-acyl glycérol de formule:



5

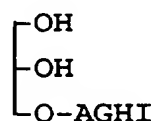
dans laquelle AGHI représente un acide gras polyinsaturé ayant de 2 à 6 doubles liaisons

R1 et R2 représentent des radicaux alcoyles inférieurs, identiques ou différents.

10

19. Un procédé d'obtention de monoacylglycérides d'AGHI (n3) selon la revendication 4 qui consiste à soumettre un 1,2 alcoylidène glyceride à une hydrolyse en milieu acide pour former un monoacylglyceride de formule:

15



20

dans laquelle AGHI est défini comme précédemment.

20. Un mélange concentré d'acides gras polyinsaturés contenant 70 % environ d'acide docosahexaénoïque et d'acide eicosapentaénoïque.

25

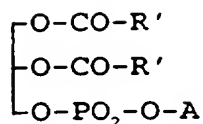
21. Un mélange concentré d'acides gras selon la revendication 20, dans lequel le rapport EPA/DHA est de l'ordre de 1.

30

22. Une huile de sardines enrichie en EPA et/ou en DHA dont la teneur en acides gras polyinsaturés varie entre 30 et 60 % chaque fois qu'elle est obtenue par le procédé de la revendication 2.

35

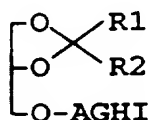
23. Les phospholipides enrichis en EPA et/ou en DHA, de formule générale:



5 dans laquelle R' représente un acide gras polyinsaturé de la série n3 ayant de 2 à 6 doubles liaisons
A représente de l'éthanolamine, de la sérine ou de la choline
dont la teneur en EPA et en DHA varie de 40 à 60% des
10 acides gras totaux.

24. Les monoesters glycériques enrichis en EPA et/ou en DHA de formule générale:

15



20

dans laquelle R1 et R2 représentent des radicaux alcoyles inférieurs

AGHI représente un acide gras polyinsaturé ayant de 2 à 6 doubles liaisons

dont la teneur en EPA et en DHA représente au moins 70% des acides gras totaux.

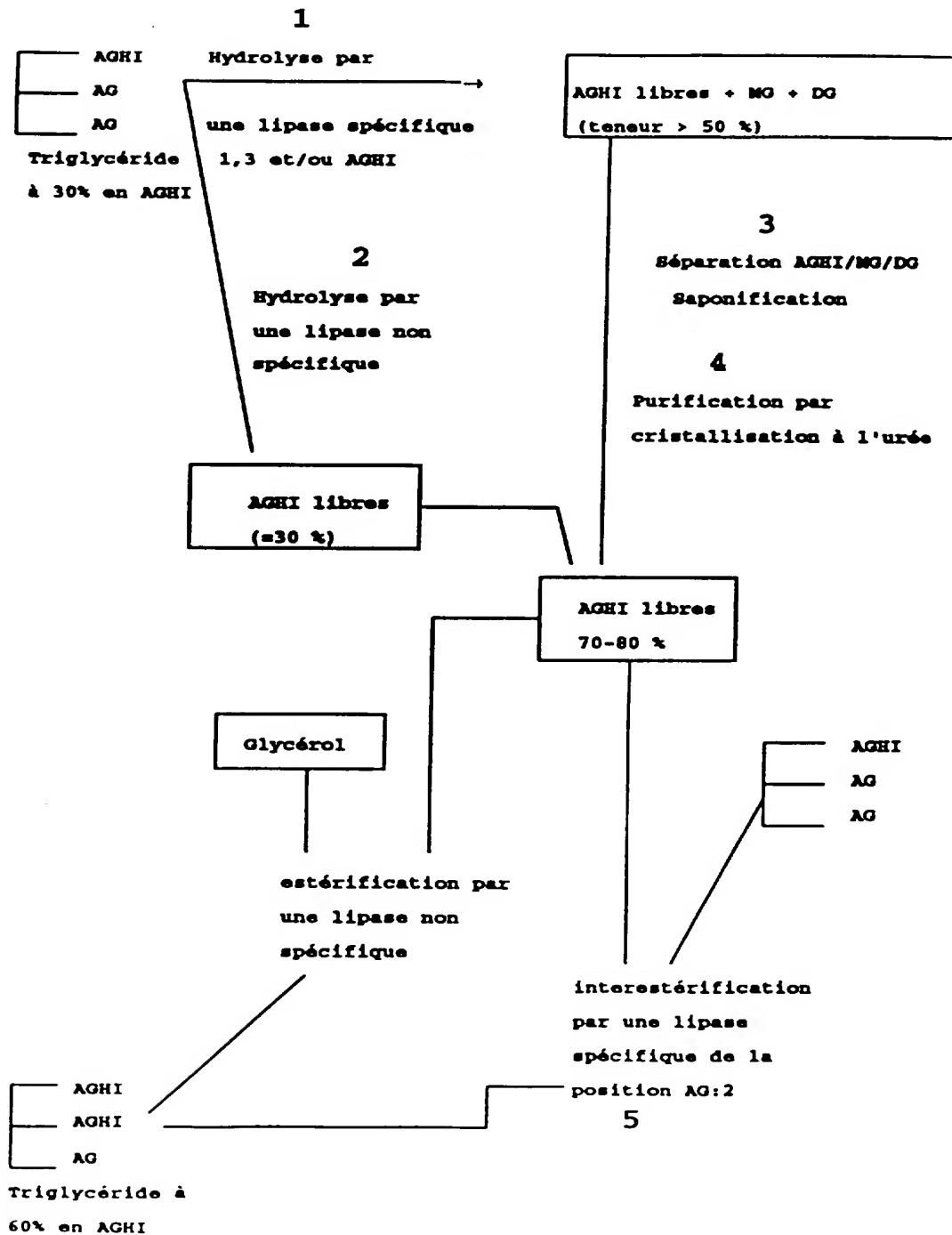
25

30

35

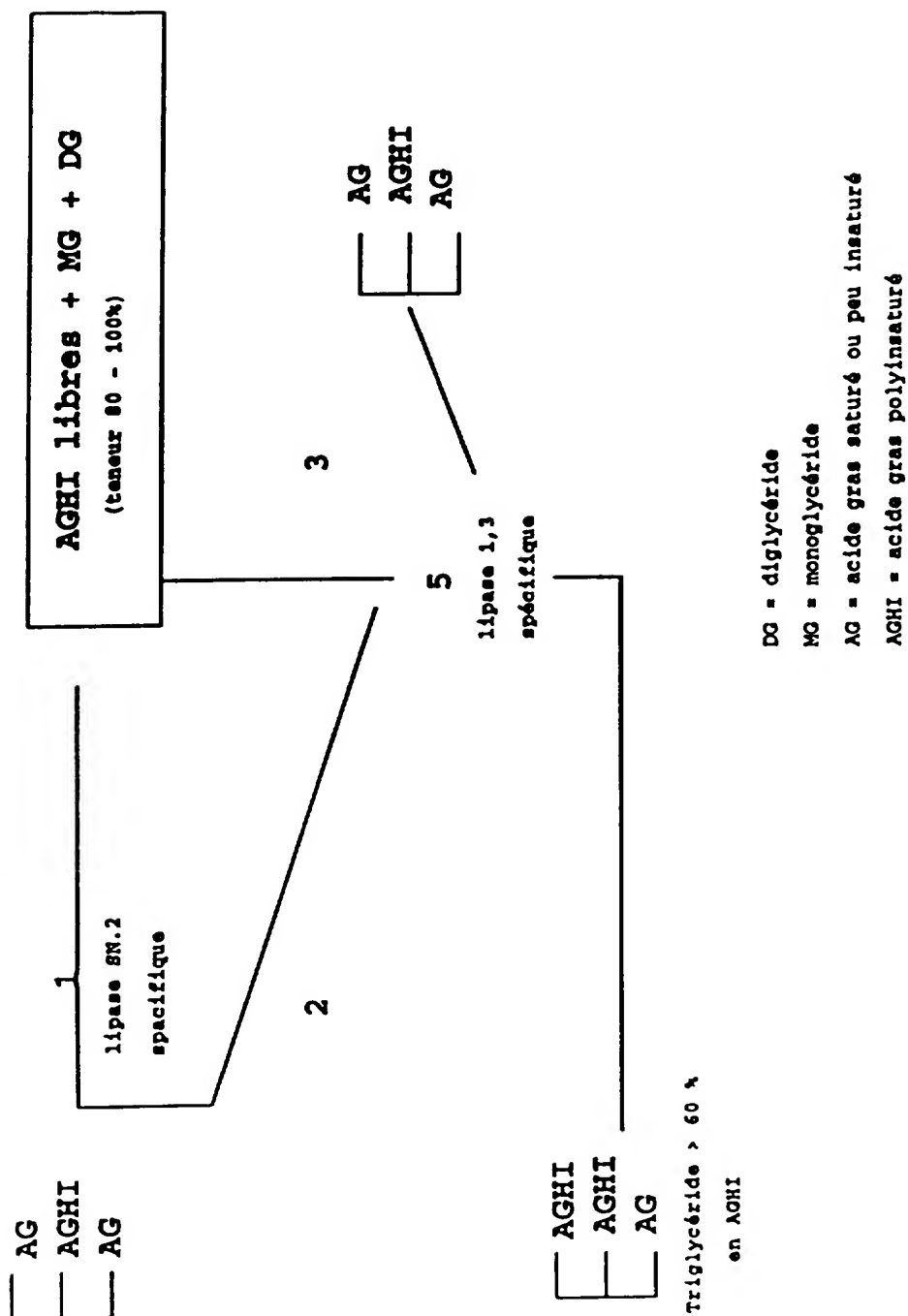
1/2

TECHNIQUE A



2/2

TECHNIQUE B



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No.
PCT/FR 96/00226

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12P7/64 C11C1/04 C11C3/02 C11C3/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12P C11C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 104, no. 17, 28 April 1986, Columbus, Ohio, US; abstract no. 147186q, page 550 ; see abstract & JP,A,60 234 589 (ASAHI DENKA KOGYO) 21 November 1985	1
Y	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 104, no. 17, 28 April 1986, Columbus, Ohio, US; abstract no. 147187r, page 550 ; see abstract & JP,A,60 234 588 (ASAHI DENKA KOGYO) 21 November 1985 --- -/-	1

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 May 1996

Date of mailing of the international search report

30.07.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patendaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

DELANGHE, L

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/FR 96/00226

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 118, no. 13, 29 March 1993, Columbus, Ohio, US; abstract no. 123028, TOYOSHIMA, TAKASHI ET AL 'Preparation of polyunsaturated triacylglycerols via transesterification catalyzed by immobilized lipase' page 674 ; see abstract & YUKAGAKU (1993), 42(1), 30-5 CODEN: YKGKAM;ISSN: 0513-398X ---	1
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 121, no. 23, 5 December 1994, Columbus, Ohio, US; abstract no. 279091, BABA, TAKASHI ET AL 'Preparation of polyunsaturated fatty acid-high triglycerides with immobilized lipase' page 894 ; see abstract & JP,A,6 217 783 (MARUHA KK, JAPAN) ---	1
Y	DATABASE WPI Section Ch, Week 8615, Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B05, AN 86-097901 & JP,A,61 043 143 (NISSHIN FLOUR MILL KK) 1 March 1986 see abstract ---	1
Y	DATABASE WPI Section Ch, Week 9320, Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B05, AN 93-163591 & JP,A,5 095 792 (AGENCY OF IND SCI & TECHNOLOGY) 20 April 1993 see abstract ---	1
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 116, no. 5, 3 February 1992, Columbus, Ohio, US; abstract no. 39796, KOKUSHO, SUMITAKA ET AL 'Manufacture of higher polyunsaturated fatty acid monoglycerides with alkaline lipase' page 629 ; see abstract & JP,A,3 108 489 (MEITO SANGYO CO., LTD., JAPAN) --- -/--	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 96/00226

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 113, no. 13, 24 September 1990, Columbus, Ohio, US; abstract no. 114028, OSADA, KYOICHI ET AL 'Modification of sardine oil by immobilized bacterial lipase' page 578 ; see abstract & YUKAGAKU (1990), 39(7), 467-71 CODEN: YKGKAM;ISSN: 0513-398X ---	1
Y	EP,A,0 417 823 (UNILEVER) 20 March 1991 see column 3; claims ---	1
Y	WO,A,90 12858 (NOVO NORDISK) 1 November 1990 see page 4; claims; examples 1-4 -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 96/00226**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- 5 inventions

See supplementary sheet PCT/ISA/210

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

1. Claim 1: method of preparing polyunsaturated fatty acid glycerides by enzymatic release of a fatty acid from a glyceride and treatment of the resulting glyceride with a polyunsaturated fatty acid in the presence of an enzyme.
2. Claims 2, 5-10, 12-15, 20-22: method of preparing polyunsaturated fatty acid glycerides by enzymatic hydrolysis of a fish oil to obtain fatty acids, isolation, purification and enrichment of these polyunsaturated acids followed by transesterification between these acids and the raw oil in the presence of a lipase.
3. Claim 11: same method but here with esterification between the polyunsaturated acids and the glycerol.
4. Claims 3, 16, 17, 23: method of enriching phospholipids with polyunsaturated fatty acids by reacting these acids with a phospholipid in the presence of a lipase.
5. Claims 4, 18, 19, 24: method of preparing monoacylglycerides by reacting 1,2-dialkylene glycerol with polyunsaturated fatty acids in the presence of a lipase.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 96/00226

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP-A-60234589	21-11-85	JP-C- 1826796 JP-B- 5033987	28-02-94 20-05-93
JP-A-60234588	21-11-85	JP-C- 1821760 JP-B- 5029433	10-02-94 30-04-93
JP-A-6217783	09-08-94	NONE	
JP-A-3108489	08-05-91	NONE	
EP-A-0417823	20-03-91	GB-A- 2236537 AU-B- 628644 AU-B- 6236990 CA-A- 2025124 JP-A- 3109495	10-04-91 17-09-92 21-03-91 14-03-91 09-05-91
WO-A-9012858	01-11-90	CA-A- 2055455 EP-A- 0469049 JP-T- 4504659	20-10-90 05-02-92 20-08-92

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 96/00226

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12P7/64 C11C1/04 C11C3/02 C11C3/10

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C12P C11C

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 104, no. 17, 28 Avril 1986, Columbus, Ohio, US; abstract no. 147186q, page 550 ; voir abrégé & JP,A,60 234 589 (ASAHI DENKA KOGYO) 21 Novembre 1985	1
Y	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 104, no. 17, 28 Avril 1986, Columbus, Ohio, US; abstract no. 147187r, page 550 ; voir abrégé & JP,A,60 234 588 (ASAHI DENKA KOGYO) 21 Novembre 1985 --- -/--	1

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

31 Mai 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

30. 07. 96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

DELANGHE, L

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 118, no. 13, 29 Mars 1993, Columbus, Ohio, US; abstract no. 123028, TOYOSHIMA, TAKASHI ET AL 'Preparation of polyunsaturated triacylglycerols via transesterification catalyzed by immobilized lipase' page 674 ; voir abrégé & YUKAGAKU (1993), 42(1), 30-5 CODEN: YKGKAM; ISSN: 0513-398X ---	1
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 121, no. 23, 5 Décembre 1994, Columbus, Ohio, US; abstract no. 279091, BABA, TAKASHI ET AL 'Preparation of polyunsaturated fatty acid-high triglycerides with immobilized lipase' page 894 ; voir abrégé & JP,A,6 217 783 (MARUHA KK, JAPAN) ---	1
Y	DATABASE WPI Section Ch, Week 8615, Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B05, AN 86-097901 & JP,A,61 043 143 (NISSHIN FLOUR MILL KK) 1 Mars 1986 voir abrégé ---	1
Y	DATABASE WPI Section Ch, Week 9320, Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B05, AN 93-163591 & JP,A,5 095 792 (AGENCY OF IND SCI & TECHNOLOGY) 20 Avril 1993 voir abrégé ---	1
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 116, no. 5, 3 Février 1992, Columbus, Ohio, US; abstract no. 39796, KOKUSHO, SUMITAKA ET AL 'Manufacture of higher polyunsaturated fatty acid monoglycerides with alkaline lipase' page 629 ; voir abrégé & JP,A,3 108 489 (MEITO SANGYO CO., LTD., JAPAN) ---	1

-/--

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Hande Internationale No
PCT/FR 96/00226

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 113, no. 13, 24 Septembre 1990, Columbus, Ohio, US; abstract no. 114028, OSADA, KYOICHI ET AL 'Modification of sardine oil by immobilized bacterial lipase' page 578 ; voir abrégé & YUKAGAKU (1990), 39(7), 467-71 CODEN: YKGKAM;ISSN: 0513-398X ---	1
Y	EP,A,0 417 823 (UNILEVER) 20 Mars 1991 voir colonne 3; revendications ---	1
Y	WO,A,90 12858 (NOVO NORDISK) 1 Novembre 1990 voir page 4; revendications; exemples 1-4 -----	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR96/00226

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n^{os} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☐ Les revendications n^{os} sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).
3. ☐ Les revendications n^{os} sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

- 5 inventions

Voir feuille supplémentaire PCT/ISA/210

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prétaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n^{os}:
4. ☒ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n^{os} /

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUÉS SUR PCT/ISA/210

1. Revendication 1: Procédé d'obtention de glycérides d'acides gras polyinsaturés par libération enzymatique d'un acide gras d'un glycéride et traitement du glycéride résultant avec un acide gras polyinsaturé en présence d'un enzyme.
2. Revendications 2,5-10,12-15,20-22: Procédé d'obtention de glycérides d'acides gras polyinsaturés par hydrolyse enzymatique d'une huile de poisson pour obtenir des acides gras, isolation, purification et enrichissement de ces acides polyinsaturés et puis une interestérification entre ces acides et l'huile brute en présence d'une lipase.
3. Revendication 11: Même procédé mais maintenant avec une estérification entre les acides polyinsaturés et le glycérol.
4. Revendications 3,16,17,23: Procédé d'enrichissement de phospholipides en acides gras polyinsaturés par réaction de ces acides avec un phospholipide en présence d'une lipase.
5. Revendications 4,81,19,24: Procédé d'obtention de monoacylglycérides par réaction de 1,2-dialcoylène glycérol avec des acides gras polyinsaturés en présence d'une lipase.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Recherche Internationale No
PCT/FR 96/00226

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
JP-A-60234589	21-11-85	JP-C- 1826796 JP-B- 5033987	28-02-94 20-05-93
JP-A-60234588	21-11-85	JP-C- 1821760 JP-B- 5029433	10-02-94 30-04-93
JP-A-6217783	09-08-94	AUCUN	
JP-A-3108489	08-05-91	AUCUN	
EP-A-0417823	20-03-91	GB-A- 2236537 AU-B- 628644 AU-B- 6236990 CA-A- 2025124 JP-A- 3109495	10-04-91 17-09-92 21-03-91 14-03-91 09-05-91
WO-A-9012858	01-11-90	CA-A- 2055455 EP-A- 0469049 JP-T- 4504659	20-10-90 05-02-92 20-08-92